

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
7. Jg., S. 369—373, Juli 1969

## Eine standardisierte Makromethode zur elektrophoretischen Auftrennung der LDH-Isoenzyme<sup>1)</sup> in einem Agarose-Agargel-Gemisch

Von W. RAPP, KARIN GOLDMANN und U. HÖPFNER

Medizinische Universitätsklinik (Ludolf-Krehl-Klinik) Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. G. Schettler)

(Eingegangen am 20. März 1969)

Es wird ein elektrophoretisches Verfahren zur Auftrennung der LDH-Isoenzyme in einem 1proz. Gemisch von Agarose und Agargel (2:1 w/w) beschrieben. Durch das Mischungsverhältnis der beiden Gelsorten kann die Elektroendosmose und damit die Verlagerung der LDH-Isoenzyme in bezug auf die Auftragsstelle variiert werden. Die Verwendung von farbmarkiertem Albumin und Vitamin B 12 gestattet eine fortlaufende optische Kontrolle der elektrophoretischen Auftrennung und die Standardisierung verschiedener Gelchancen. Die Auftrennung erfolgt auf Glasplatten von 9 × 12 cm in Kunststoff-Trennkammern, die durch fließendes Leitungswasser gekühlt werden. Dadurch können Effektivspannungen von 10—18 V/cm bei einer Auftrennungsdauer von 60—100 Minuten angelegt werden. Simultan wurden bis zu 56 Proben aufgetrennt. Zubereitung des Agargels, elektrophoretische Auftrennung und enzymatische Inkubation erfolgen innerhalb des gleichen Puffersystems. Die densitometrische Registrierung wird unmittelbar nach der Darstellung der Isoenzyme ohne vorausgehende Fixierung und Trocknen der Platte durchgeführt. Über methodische und technische Fehler, sowie über Normalverteilungswerte wird berichtet.

### *A standardized macromethod for the electrophoretic separation of LDH-isoenzymes in a mixture of agargel and agarose*

The authors have developed a method for the routine electrophoretic separation of lactate dehydrogenase (LDH)<sup>1)</sup> isoenzymes using a mixture of agarose and agargel (2:1; w/w). The electrophoretic separation is performed as a macromethod on glass plates of 9 × 12 cm in gel containers placed on aluminium blocks which are cooled by running tap water. A voltage of 10—18 Volt/cm gel can thus be applied. The separation requires from 60 to 100 minutes. 56 specimens can be separated in one run. The migration behaviour can be visually controlled, the relative mobilities of bands calculated, and the gel mixture standardized by using vitamin B 12 (Cytobion, 1000 µg/ml) and serum albumin dyed with bromophenol blue. The preparation of the gel, the electrophoretic separation and enzymatic incubation are performed in the same Na-Veronal-HCl-puffer. Densitometric evaluation is performed immediately after separation without fixation or dessication of the gel. Sources of methodological and technical errors are reported. Normal values for the relative percent of LDH-bands and their distribution pattern in a normal population (n = 60) have been established.

Von den bisher bekannten Verfahren zur Differenzierung der LDH-Isoenzyme<sup>1)</sup> (Zusammenstellung bei 1) hat sich für die klinische Routinediagnostik die von WIEME (2) eingeführte Agargel-Elektrophorese mit der von HELM (3, 4) beschriebenen Anfärbetechnik besonders bewährt. Nachteile der bisher verwendeten Agargel-Elektrophorese sind: Unterschiedliche elektroendosmotische Eigenschaften verschiedener Gelsorten, die zu Verlagerungen der LDH-Isoenzymbanden LDH<sub>2</sub> oder LDH<sub>3</sub> in die Auftragsstelle und damit zu Registrierfehlern führen, mangelnde Auftrennbarkeit der Banden LDH<sub>4</sub> und LDH<sub>5</sub> in bestimmten Agargelsorten, sowie geringe Auftrennkapazitäten und besondere Kühlvorrichtungen. Im folgenden wird eine Methode beschrieben, die auf Grund des verwendeten Auftrennformats auf Glasplatten von 9 × 12 cm im Gegensatz zu den bisher verwendeten „Mikromethoden“ auf Objektträgern als „Makromethode“ bezeichnet wird. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren, das in Anpassung an Gel-Elektrophoresen (5) von BROWN und AVRAMEAS (6) beschrieben und in folgenden Einzelheiten von uns modifiziert wurde: Verwendung eines Agarose-Agargel-Gemisches, das entsprechend seiner Zusammensetzung eine Variation der Elektroendosmose und damit eine optimale Verlagerung der LDH-

Banden LDH<sub>3</sub> und LDH<sub>4</sub> von der Auftragsstelle erlaubt; fortlaufende optische Kontrolle und somit exaktere Reproduzierbarkeit der elektrophoretischen Auftrennungen durch ein Gemisch von Vitamin B 12 und farbmarkiertem Albumin (7), Verwendung einer Auftrennvorrichtung mit Wasserkühlung und eines einheitlichen Puffersystems für elektrophoretische Auftrennung und enzymatische Inkubation.

### Methodik

#### *Geräte*

Als elektrophoretische Auftrenneinheit wurde das UGI-Gerät (Fa. Desaga, Heidelberg) mit dem dazugehörigen Netzspeisegerät (max. Abgabe von 500 mA und 500 V) verwendet. Die kolorimetrische Registrierung erfolgte mit dem „Vitatron“-Densito-Photometer, Typ UFD, unter Verwendung des Filters Nr. 574.

#### *Herstellung des Agarose-Agargel-Gemisches*

1% Gel in 0,025M Na-Veronal-HCl Puffer pH 8,2: 2 g Agarose (Serva-Labor, Heidelberg) und 1 g Agar Difco Nobel werden mit 150 ml dest. Wasser aufgeköcht. Nach Verflüssigung des Gelgemisches werden 150 ml 0,05M Na-Veronal-HCl Puffer pH 8,2 zugegossen. Das Gel ist dann gebrauchsfertig und reicht für 6 Trennkammern (36 Proben) aus.

#### *Ausguß der Gelplatten*

Glasplatten von 9,0 × 12,0 × 0,1 cm werden in die Trennkammern 9 × 12 cm (Auftrennrichtung 9 cm) eingelegt. Die zu den Puffertrögen führenden Öffnungen der Trennkammern sind von unten mit Pflaster zu verschließen. Unter leichtem Andrücken der

<sup>1)</sup> LDH = Lactatdehydrogenase = L-Lactat: NAD Oxydoreduktase (EC 1.1.1.27).

Glasplatte mit einem Spatel werden 50 ml des Gelgemisches pro Trennkammer eingegossen. Nach Erstarren des Gels werden 3 cm von dem kathodischen Ende der Trennkammern entfernt 6 Auftragsreservoir mit einer Längsstanze von  $1,2 \times 0,2$  cm eingestanzst und mit einem feinen Spatel oder mit einer an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen Pasteurpipette ausgehoben. Auf gleicher Höhe wird seitlich mit einer Rundstanze von 0,2 cm Durchmesser ein Reservoir zur Aufnahme des Albumin-Vitamin B 12-Gemisches ausgehoben. Eine gleichmäßige Gelschicht ist durch die horizontale Lagerung der Trennkammern auf einem Nivelliertisch gewährleistet.

#### Auftragen der Proben

Das Untersuchungsmaterial (Serum vom Menschen) wird im Verhältnis 1:1 (v/v) mit dem auf etwa  $50^\circ$  abgekühlten Gel gut vermischt. Davon werden mit einer auf etwa  $50^\circ$  angewärmten Pipette 0,05 ml ( $\triangleq 25 \mu\text{l}$  Serum) in das Reservoir eingefüllt und nach dem Erstarren mit einem Tropfen des zum Ausguß der Trennkammern verwendeten Gels abgedeckt. Das seitlich angebrachte Rundreservoir wird zur fortlaufenden optischen Kontrolle der Auftrennung mit einem Gemisch von mit Bromphenolblau markiertem Albumin (Serva-Labor, Heidelberg) und Vitamin B 12 (Cytobion, Fa. Merck, Darmstadt,  $1000 \mu\text{g/ml}$ ) im Verhältnis 1:1 (v/v) aufgefüllt. Handelt es sich um pathologische Seren mit einer LDH-Gesamtaktivität von mehr als 300 mU/ml, so ist die Probe zuvor mit 0,15M NaCl-Lösung zu verdünnen. Bei sehr geringen LDH-Gesamtaktivitäten (unter 60 mU/ml) wird die Probe 2:1 (v/v) mit dem Gel vermischt und davon 0,075 ml bis 0,1 ml in das Reservoir eingebracht (max.  $66 \mu\text{l}$  einer Probe).

#### Elektrophoretische Auftrennung

Als Elektrodenpuffer wird 0,05M Na-Veronal-HCl Puffer pH 8,2 verwendet. Nach Entfernung der Klebestreifen werden die Trennkammern auf die Kühlblöcke in die Puffertröge eingesetzt. Die Kühlung erfolgt durch fließendes Leitungswasser und erlaubt je nach Bedarf eine Effektivspannung von 10–18 V/cm Gel. Während der elektrophoretischen Auftrennung wandert das blaufärbte Albumin in Richtung Anode und das rötlich gefärbte Vitamin B 12 in Richtung Kathode. Eine optimale Auftrennung ist gegeben, wenn der Abstand von der Mitte des Auftragsreservoirs zu den extremen Fronten von Albumin = 4 cm und Vitamin B 12 = 2 cm beträgt. Je nach applizierter Spannung dauert die Auftrennung 60–100 Min. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung (18 Proben in 3 Trennkammern) wird der Elektrodenpuffer aus beiden Trögen gut durchmischt und kann nochmals für eine weitere Auftrennung von insgesamt 18 Proben verwendet werden.

Die Bestimmungen der relativen Mobilitäten der einzelnen LDH-Banden erfolgt nach früheren Angaben (7).

#### Anfärbung der LDH-Isoenzyme

##### Reagenzien:

L-Milchsäure (Na-Salz), NAD, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, reinst), Natriumcyanid, p. A., Phenazinmethosulfat rein (N-methylphenazinium-methylsulfat), alle (Serva, Heidelberg).

##### Lösungen:

1. Na-Veronal-HCl-Puffer (pH 8,2; 0,05M).
2. Natriumlactat-Lösung: Mit dest. Wasser wird eine 60proz. Na-Lactatlösung hergestellt und auf pH 8,2 eingestellt.
3. Substratlösung: In 400 ml Puffer werden gegeben: 200 mg NAD, 1100 mg Natriumcyanid, 200 mg MTT und 20 ml der Natrium-Lactat-Lösung. Dieses Gemisch wird unter leichtem Erwärmen (max.  $40^\circ$ ) mit einem Magnetrührer zur Lösung gebracht. Die Menge von 400 ml Substratlösung reicht für 20 Trennkammern (120 Proben) aus. Sie ist bei  $4^\circ$  2–4 Wochen haltbar.

##### Inkubation der Gelplatte:

In einem Reagenzglas werden 20 ml Substratlösung mit einer feinen Spatelspitze (etwa 1–2 mg) Phenazinmethosulfat ver-

mischt und auf die Trennkammer gegossen. Diese wird mit einer Glasplatte zum Schutz vor Verdunstung abgedeckt und unter Lichtabschluß in einen Brutschrank von  $37^\circ$  gebracht. Die Dauer der Inkubation beträgt normalerweise 75 Min. Bei hoher LDH-Gesamtaktivität ist die Dauer der Inkubation zu verkürzen.

#### Vorbereitung zur Registrierung:

Nach Darstellung der Isoenzyme wird das Substrat abgegossen und die Gelschicht mit Leitungswasser vorsichtig abgespült. Das Auftragsreservoir wird mit der Gelstanze oder mit einer Spritzflasche mit scharfem Wasserstrahl ausgehoben, von umliegenden Gelresten gereinigt und mit Filterpapier sorgfältig ausgetrocknet. Die Glasplatte wird anschließend zur Registrierung aus der Trennkammer entfernt. Eine Fixierung erfolgt nicht.

#### Photometrische Registrierung der Isoenzyme

Die auf der Unterseite gesäuberte Gelplatte wird auf eine saubere Glasplatte von  $13 \times 18$  cm gesetzt und auf das Transportband des Photometers gebracht. Die Registrierung erfolgt von der Anode ausgehend (Blende  $1,0 \times 0,2$  cm, Papiergeschwindigkeit 2,5 mm/Sek.). Nach erfolgter Registrierung wird die Gelschicht der Glasplatte verworfen. Die Berechnung der einzelnen LDH-Isoenzyme erfolgt in Relativprozent mit Hilfe der automatischen Integration.

#### Methodische Modifikationen

Vergleichende Untersuchungen haben ergeben, daß die Verwendung von gebrauchsfertigen Agargelgemischen in einem Na-Phosphat-Na-Veronal-Puffersystem die gleichen elektrophoretischen Eigenschaften des hier geschilderten Gel-Puffergemisches besitzen (Instantgel-LDH-10-82, Serva-Labor, Heidelberg). An Stelle von MTT kann p-Nitroblautetrazoliumchlorid verwendet werden.

## Ergebnisse

#### Elektrophoretische Auftrennung

Eine typische Auftrennung der LDH-Isoenzyme geht aus Abbildung 1 hervor. Die Bezeichnung der LDH-Isoenzyme erfolgte wie üblich von der Anode ausgehend zur Kathode mit  $\text{LDH}_1$ – $\text{LDH}_5$ . Die Banden  $\text{LDH}_1$ ,  $\text{LDH}_2$  und  $\text{LDH}_3$  liegen im anodischen, die Banden  $\text{LDH}_4$  und  $\text{LDH}_5$  im kathodischen Bereich. Die relativen Mobilitäten der einzelnen LDH-Isoenzymbanden betragen:  $\text{LDH}_1 = 0,90$ ,  $\text{LDH}_2 = 0,67$ ,  $\text{LDH}_3 = 0,43$ ,  $\text{LDH}_4 = 0,19$  und  $\text{LDH}_5 = 0,00$ .

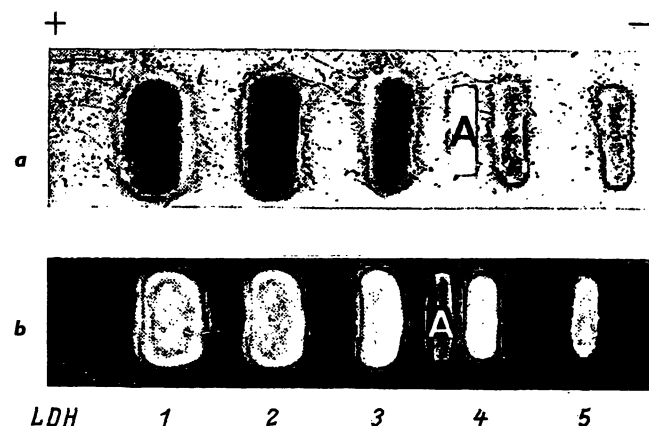


Abb. 1  
Elektrophoretische Auftrennung der LDH-Isoenzyme von normalen Humansenen (Originalgröße)  
Agarose-Agar-Gelgemisch (2:1; w/w), Na-Veronal-HCl-Puffer (pH 8,2; 0,025M), Effektivspannung 10 V/cm; 60 mA. Aufnahme nach Inkubation: a) Positiv nach Kleinbildaufnahme, b) Negativaufnahme auf Papier (Multiskop, Fa. Desaga, Heidelberg). A = Auftragsstelle

Das im Verhältnis 2:1 angesetzte Agarose-Agargel-Gemisch ergibt eine elektroendosmotische Verschiebung der LDH-Isoenzymbanden zur Kathode, die in der Agarose größer als in dem Agargel ist (Tab. 1). Dementsprechend liegt bei dem hier gewählten Gel-Gemisch das Auftrennreservoir der Banden zwischen LDH<sub>3</sub> und LDH<sub>4</sub>.

Tab. 1  
Elektroendosmotische Eigenschaften verschiedener Gelarten

	Wanderungsstrecke (cm) von		Endosmose- Quotient**	LDH-Bande im Auftrags- reservoir
	Albumin*	Vitamin B 12*		
Agargel 1%	3	3	1,0	LDH <sub>3</sub>
Agarose 1%	6	1	0,17	LDH <sub>4</sub>
Agarose-Agargel- Gemisch 2:1, 1%	4	2	0,50	keine

\* Abstand der extremen Front vom Auftragsreservoir (R).

\*\* Berechnet als Quotient  $\frac{B_{12}-R}{Alb.-R}$ .

### Photometrische Registrierung

In Abbildung 2 wird das Ergebnis einer photometrischen Registrierung eines Normalserums dargestellt. Das Auftragsreservoir wird als 1- bis 2-gipfliger Ausschlag registriert und setzt sich deutlich von den Banden LDH<sub>3</sub> und LDH<sub>4</sub> ab. Der Abstand von der Null-

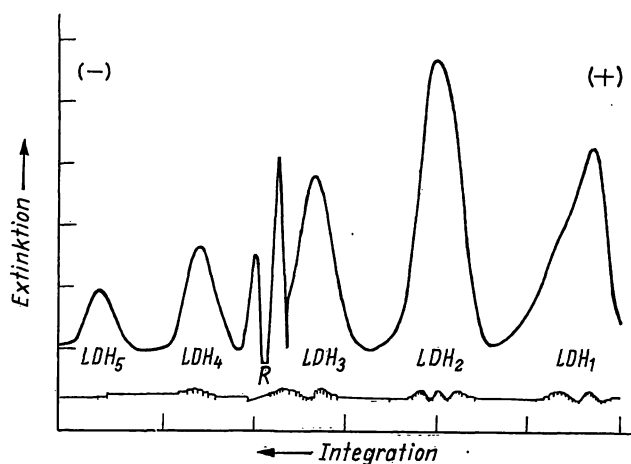


Abb. 2

Densitometrische Registrierung der LDH-Isoenzyme („Vitatron“ Photometer, Typ UFD). Filter Nr. 574, Spaltbreite der Blende 1,0 x 0,2 cm, Papiergeschwindigkeit 2,5 mm/Sek. Maßstab: 1:2

Linie bis zu den geringsten registrierten Werten beträgt auf dem Original max. 1,5 cm.

### Methodische Fehler

Aus der Tabelle 2 geht hervor, daß die gleichzeitige Auftrennung einer Probe in verschiedenen Trenn-

Tab. 2

Methodische Fehler durch Registrierung und Auftrennung. Normales Serum wurde nach einer Auftrennung 10mal wiederholt registriert. Ein weiteres normales Serum wurde 10mal gleichzeitig aufgetrennt

	LDH <sub>1</sub>	LDH <sub>2</sub>	LDH <sub>3</sub>	LDH <sub>4</sub>	LDH <sub>5</sub>
10fache Registrierung $\sigma$	1,51 %	2,25 %	0,6 %	1,0 %	0,15 %
10fache Auftrennung $\sigma$	2,5 %	3,25 %	3,25 %	1,3 %	0,97 %

kammern größere Streuungen der einzelnen Werte ergibt, als die 10fache Registrierung einer einzigen Auftrennung. Somit sind die durch die Auftrennung bedingten methodischen Fehler etwas größer als jene, die durch die Registrierung bedingt sind.

### Normalwerte

Die aus einer Gruppe von 60 Normalpersonen im Alter von 20 bis 60 Jahren in Relativprozent der LDH-Isoenzyme bestimmten Normalwerte gehen aus der Tabelle 3 hervor. In allen Fällen ergibt sich folgendes Normal-Verteilungsmuster: LDH<sub>2</sub> > LDH<sub>1</sub> > LDH<sub>3</sub> > LDH<sub>4</sub> > LDH<sub>5</sub> (Abb. 3, 4).

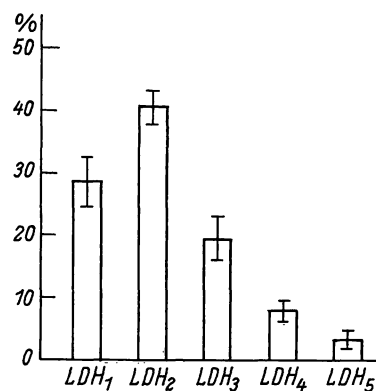


Abb. 3

Normalwerte der LDH-Isoenzyme im Serum von 60 gesunden Personen. Die Berechnung erfolgte in Relativ-Prozent

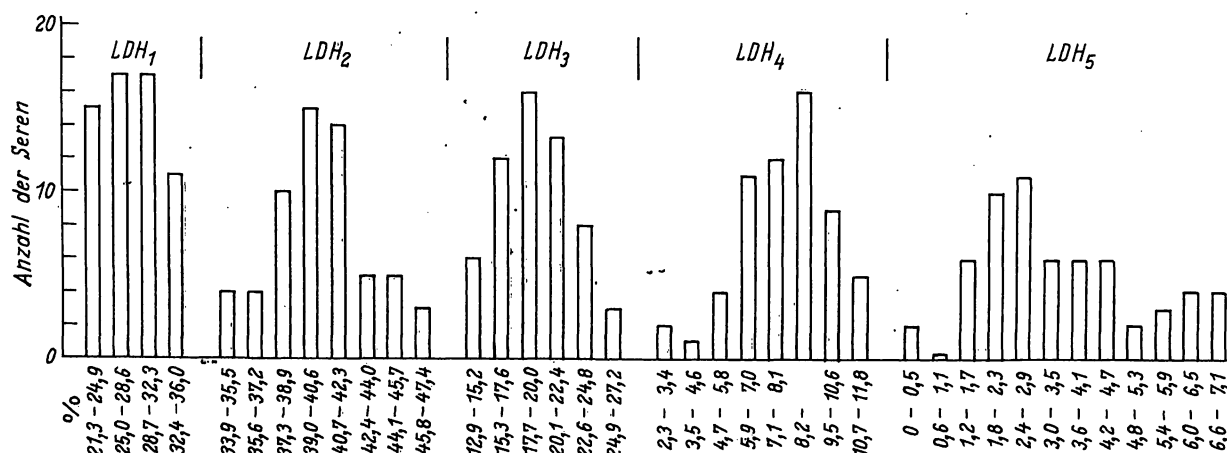


Abb. 4

Die Häufigkeitsverteilung der Serum-LDH-Isoenzyme bei 60 Normalpersonen

Tab. 3  
Normalwerte der prozentualen elektrophoretischen Verteilung der LDH-Isoenzyme in Humanseren (n = 60)

	LDH <sub>1</sub>	LDH <sub>2</sub>	LDH <sub>3</sub>	LDH <sub>4</sub>	LDH <sub>5</sub>
$\bar{x}$	28,5 %	40,5 %	19,4 %	8,1 %	3,5 %
$\sigma$	3,8 %	2,8 %	3,6 %	2,0 %	1,7 %
$\bar{x} \pm 2 \sigma$	20,9—36,1 %	34,9—46,1 %	12,2—26,6 %	4,1—12,1 %	0,1—6,9 %
Extrembereich	21,3—36,0 %	33,9—47,4 %	12,9—27,2 %	2,3—11,8 %	0,0—7,1 %

### Technische Fehlerquellen

Anlässlich der routinemäßigen Auftrennung von über 3000 Proben zeigten sich folgende Fehlerquellen:

1. Zu- oder Abnahme der Elektroendosmose (zu beurteilen über den Abstand von Vitamin B 12 vom Reservoir) und Verlagerung der Banden LDH<sub>3</sub> bzw. LDH<sub>4</sub> in das Auftragsreservoir: In diesem Falle ist die Überprüfung des Mischungsverhältnisses von Agarose und Agargel erforderlich. Bei Zunahme der Elektroendosmose (Abstand Vitamin B 12 zum Reservoir wird größer): Zugabe von Agarose; bei Abnahme der Elektroendosmose (Abnahme des Abstandes Vitamin B 12 zum Reservoir): Zugabe von Agargel
2. Zunahme der Mobilitäten der Banden LDH<sub>1</sub> und LDH<sub>2</sub>, Verlagerung von LDH<sub>4</sub> in das Reservoir und schwache Anfärbung von LDH<sub>5</sub> können durch Elektrolyse des Elektrodenpuffers hervorgerufen werden. Dies erfordert Erneuerung des Puffers.
3. Ungenügende Anfärbung der Bande LDH<sub>5</sub> kann durch Hitzeinaktivierung während der Vermischung mit dem Gelgemisch (Temperaturen über 50°) hervorgerufen werden. Eine weitere Ursache kann in dem pH des Substratgemisches liegen (unzureichende Einstellung des pH der 60proz. Natriumlactatlösung).
4. Anlässlich der Registrierung setzt sich das Auftragsreservoir nicht genügend von den Banden LDH<sub>3</sub> und LDH<sub>4</sub> ab. Dies kann durch ungenügende Reinigung des Gelreservoirs oder durch Gelreste bedingt sein, mit denen das Gel-Probengemisch abgedeckt wurde. Eine sorgfältige Reinigung der Auftragsstelle ist in diesem Falle erforderlich.
5. Ungenügende oder fehlende Anfärbung der LDH-Isoenzyme finden sich bei: Alterung, mikrobieller Zersetzung des Substrates und Fehlen von Phenazinmethosulfat.

### Diskussion

Das hier geschilderte Verfahren hat sich bis jetzt in über 3000 Auftrennungen von normalen und pathologischen Seren, Körperflüssigkeiten und Organextrakten bewährt. Durch die Verwendung eines Gemisches von zwei verschiedenen Gelsorten mit unterschiedlicher Elektroendosmose und unterschiedlicher LDH-Isoenzymverteilung ließ sich eine geeignete Elektroendosmose und somit eine optimale Verteilung der LDH-Banden in Beziehung zu dem Auftragsreservoir herstellen. Damit wurden Registrierfehler

durch die Verlagerung einer LDH-Bande in das Auftragsreservoir vermieden. Durch die Verwendung von farbmarkiertem Albumin und Vitamin B 12 konnte das Gelgemisch in seinem elektroendosmotischen Verhalten und in seiner Zusammensetzung genau überprüft und standardisiert werden (7). Gleichzeitig war eine fortlaufende optische Kontrolle der elektrophoretischen Auftrennung gewährleistet, so daß exakte Reproduktionen innerhalb verschiedener Zeiträume möglich waren. Durch die Verwendung des relativ großen Auftragsreservoirs von  $1,2 \times 0,2$  cm war es möglich, auch Isoenzymmuster von Körperflüssigkeiten mit geringer LDH-Gesamtaktivität gut zur Darstellung zu bringen.

Technisch bedingte Vorteile des hier geschilderten Verfahrens sind:

Applikation hoher Feldspannung bei wirksamer Kühlung durch fließendes Leitungswasser, Durchführung mehrerer Arbeitsprozesse in einem Arbeitsbehälter (Trennkammer) und umfassende Auftrennkapazität für den Routinebetrieb (simultane Auftrennung von 18 Proben/Kühlblock, 54 Proben bei voller Ausnützung des Netzspeisegerätes).

Im Gegensatz zu den bisher geschilderten Verfahren erfolgte die enzymatische Inkubation in dem für Gelzubereitung und Elektrophorese verwendeten Natrium-Veronal-HCl-Puffersystem bei pH 8,2.

Die densitometrische Auswertung erfolgte sofort nach der Darstellung der Isoenzyme. Auf eine Fixierung der aufgetrennten Isoenzymbanden und auf das Trocknen der Gelschicht konnte somit verzichtet werden.

Die methodischen Fehler des Verfahrens liegen in der üblichen Größenordnung elektrophoretischer Auftrennungen und enzymatischer Messungen. Das normale Verteilungsmuster der Serum-LDH-Isoenzyme, das mit der hier beschriebenen Makromethode beobachtet wurde, entspricht den Ergebnissen, die mit den bisherigen Mikromethoden erzielt wurden. Vergleicht man jedoch die Relativprozentwerte der einzelnen Banden mit den Werten von LEHMANN und Mitarbeitern (1), die nach dem Verfahren von WIEME (2) erzielt wurden, so ergeben sich deutliche Unterschiede in den Relativprozenten verschiedener LDH-Banden. In der vorliegenden Mitteilung ist der Mittelwert der LDH<sub>2</sub> im Vergleich zu den Ergebnissen von LEHMANN und Mitarbeitern geringer (40,5%/51,64%). LDH<sub>3</sub> (19,4%/11,58%) und LDH<sub>4</sub> (8,1%/4,4%) sind deutlich größer. Es ist anzunehmen, daß für diese Unterschiede die methodisch bedingten unterschiedlichen räumlichen Beziehungen der LDH-Banden zu den Auftragsstellen

eine Rolle spielen. Dies müßte jedoch in einer vergleichenden Untersuchung mit identischen Serumproben bestätigt werden. Der ohne Zweifel gegenüber den Mikroverfahren auf Objektträgern bestehende Nachteil des größeren Materialverbrauches an Gel

und Substrat wird durch die vereinfachte methodische Handhabung, durch das größere Auftragsvolumen und durch die umfassende Auftrennkapazität aufgewogen.

#### Literatur

1. LEHMANN, F. G., G. SCHNEIDER, G. SCHERING und V. KOCH, Z. Vitamin, Hormon, Fermentforsch. 14, 301 (1966). — 2. WIEME, R. J., Clin. chim. Acta, Amsterdam 4, 46 (1959). — 3. VAN DER HELM, H. J., Clin. chim. Acta, Amsterdam 7, 124 (1962). — 4. VAN DER HELM, H. J., H. A. ZONDAG, H. A. HARTOG und M. W. VAN DER KOOI, Clin. chim. Acta, Amsterdam 7, 540 (1962). — 5.

GRABAR, P. und P. BURTIN, Immuno-elektrophoretische Analyse. Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York (1964). — 6. BROUN, G. und S. AVRAMEAS, Bull. Soc. Chim. (Paris) 45, 233 (1962). — 7. RAPP, W., Clin. chim. Acta, Amsterdam 15, 177 (1967).

Dr. W. Rapp,  
D 69 Heidelberg  
Bergheimerstr. 58